

EXPRESSIÓ DE VEGF COM A FACTOR PRONÒSTIC INDEPENDENT DE RECAIGUDA A LA MALALTIA DE HODGKIN

TREBALL DE RECERCA CONVOCATÒRIA DE SETEMBRE DE 2010

Autor: Francesc Jesús Mestre Mestre

Titulació: Llicenciat en Medicina i Cirurgia General

Especialista en Oncologia Radioteràpica

Departament: Servei d'Oncologia Radioteràpica

Centre: Hospital Universitari Son Dureta

**Director: Dr. Andrés López Hernández. Professor Titular del
Departament de Medicina UAB i adjunt del Sevei d'Hematologia de
l'Hospital de la Vall d'Hebrón.**

**Codirectors: 1. Dr. Antonio Gutiérrez García. Adjunt del Sevei
d'Hematologia de l'Hospital Universitari Son Dureta**

**2. Dr. José Rodríguez Díaz-Pavón. Adjunt del Sevei de
Medicina Interna de l'Hospital Universitari Severo-Ochoa**

**DEPARTAMENT DE MEDICINA
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

ÍNDEX

	Pag.
RESUM	4
INTRODUCCIÓ	
I. Conceptes de vasculogènesi i angiogènesi	5
II. Record històric	6-7
III. Angiogènesi	
IIIa. Reguladors	8-11
IIIb. Família VEGF	11-15
IIIc. Procés angiogènic	15-16
IV. Angiogènesi en els tumors hematològics	
IVa. Limfomes, mieloma i leucèmies	16-23
IVb. Malaltia de Hodgkin	
IVb.1. Generalitats	23-25
IVb.2. Diagnòstic	25-26
IVb.3. Tipus histològics	26-29
IVb.4. Factors pronòstics	29-33
IVb.5. Tractament	33-35
TREBALL DE RECERCA	
V. Resum	36
VI. Hipòtesi de treball	36-37
VII. Objectiu	37
VIII. Introducció	38
IX. Material i mètodes	39- 41

X. Resultats	41-48
XI. Discussió	49-50
XII. Conclusions	50
XIII. Bibliografia	51

RESUM

El paper del fenomen angiogènic en els diferents tumors sòlids ha estat l'objectiu de nombrosos estudis en els darrers anys. La importància d'aquest procés en les neoplàsies d'origen hematològic encara és bastant desconeguda.

En aquest treball hem estudiat l'expressió immunohistoquímica del factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF) en els "tissue microarrays" (TMA) de 252 pacients diagnosticats de limfoma de Hodgkin tractats de forma homogènia (poliquimioteràpia esquema ADVD amb o sense radioteràpia) entre els anys 1978 i 2003. Els resultats s'han correlacionat amb l'evolució dels pacients i s'ha avaluat la seva importància en la supervivència lliure de malaltia i supervivència global de la sèrie.

INTRODUCCIÓ

I. Conceptes de vasculogènesi i angiogènesi

El desenvolupament del sistema vascular es produeix per dos mecanismes, vasculogènesi i angiogènesi. Definim la vasculogènesi com la formació de novo de vasos per diferenciació i acoblament de precursors mesodèrmics indiferenciats. Aquests precursors s'uneixen, s'alineen formant cordons que desenvolupen una cavitat interna i donen lloc a capil·lars primitius. D'altra banda l'angiogènesi consisteix en un procés cel·lular molt ben regulat, pel qual vasos ja establerts produeixen ramificacions i envaeixen teixits en resposta a estímuls normals o patològics¹.

La correcta regulació del procés angiogènic és fonamental en diferents processos fisiològics com puguin ésser el desenvolupament placentari, la proliferació endometrial en el cicle menstrual, la cicatrització de les ferides, etc....

En canvi, quan hi ha una defectuosa regulació d'aquest procés, s'esdevenen situacions patològiques com per exemple la retinopatia diabètica, la psoriasi, el creixement tumoral, la invasió tumoral, la disseminació metastàsica i el creixement d'aquests dipòsits metastàsics^{1,2}.

II. Record històric

A l'any 1939 Ide i cols. van postular per primera vegada l'existència d'algun tipus de factor estimulant del creixement dels vasos sanguinis tumorals que afavoriria el creixement de les neoplàsies. Pocs anys després, Algire et al. proposaren que l'augment de densitat vascular a nivell local és un fenomen previ a un ràpid creixement tumoral. Els experiments duts a terme als anys 60 per Greenblat i Shubik així com per Ehrmenn i Knoth aportaren evidència que l'angiogènesi tumoral estava mediada per factors difusibles produïts a nivell tumoral³.

Va ser a l'any 1971 quan el Dr. Judah Folkman va plantejar la hipòtesi que el bloqueig angiogènic pot ésser una estratègia eficaç en el tractament del càncer.

En base a aquesta hipòtesi, Folkman i els seus col.laboradors iniciaren la recerca d'un "factor angiogènic tumoral" en diferents tumors animals i humans⁴.

A principis dels anys 70 Gullino també suggerí que el bloqueig angiogènic podria ser una estratègia útil en la prevenció del càncer. Conseqüentment, els efectes angiogènics d'una gran varietat de factors es van descriure: TGF- α , TGF- β , TNF- α , EGF i angiogenina.

Gran part de l'atenció es dirigia cap a dos potents mitògens i factors angiogènics de la cèl.lula endotelial àmpliament distribuïts: els factors de creixement de fibroblasts àcids i bàsics (aFGF i bFGF). La purificació, classificació i clonatge del cDNA dels FGFs es va publicar en el 1980.

Un descobriment interessant va ser que els gens tant per a aFGF com per a bFGF no codifiquen un pèptid de senyal de secreció convencional. Com els estudis anteriors suggerien, l'angiogènesi tumoral era mediada per mol·lècules difusibles. A més, uns quants estudis indicaven que la immunoneutralització de FGF tenia

poc o cap efecte sobre l' angiogènesi tumoral, suggerint que els reguladors clau d'angiogènesi encara havien d'ésser identificats.

El 1983, Senger et al.⁵ comunicava la purificació parcial en un medi condicionat d'una línia cel·lular de tumors de porc de Guinea del 'factor de permeabilitat vascular' (VPF). Tanmateix, degut a que el VPF no s'aïllava i no es posava en seqüència, aquest factor romangué desconegut en aquella època.

El 1989, es comunicava l'aïllament del factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF), un mitogen endotelial cel·lular. La seqüència d'aminoàcids terminals de VEGF no lligava amb cap proteïna coneguda. Subseqüentment, Connolly et al.⁶, investigant el treball fet per Senger i col·laboradors, comunicava l'aïllament i classificació de VPF. El clonatge de cDNA de VEGF i de VPF pel de Connolly, mostrava que el VEGF i VPF eren la mateixa molècula. Això era sorprenent, comptant que uns altres mitògens de la cèl·lula endotelial com FGF no augmenten la permeabilitat vascular^{1,3}.

III. Angiogènesi

IIIa. Reguladors

La formació i el creixement dels vasos és un fenomen estrictament regulat. Quan s'ha completat el creixement vascular, l'angiogènesi es converteix en un procés patològic que acompanya a l'aparició de malalties neoplàsiques i no neoplàsiques. L'establiment de fenòmens d'angiogènesi comporta una alteració en l'equilibri entre molècules proangiogèniques i antiangiogèniques. Aquestes molècules poden intervenir en múltiples passos en el procés de l'angiogènesi, i també poden condicionar la funció de les diverses estirps cel·lulars no involucrades en aquest fenomen⁷.

Un factor angiogènic és un factor que selectivament altera les característiques de les cèl·lules endotelials i estructures perivasculars associades (pericits, cèl·lules musculars llises de les parets vasculars, etc.), però no afecta la funció d'altres tipus cel·lulars. De tots els factors descrits estimulants de l'angiogènesi, el principal es l'anomenat VEGF. Aquest factor es troba descrit en aquest treball de forma més amplia en el següent capítol. Els principals factors amb activitat proangiogènica i antiangiogènica descrits, es troben representats a les següents taules^{1,7-9}:

Taula 1. Principals factors angiogènics i les seves funcions.

ACTIVADORS	FUNCIÓ
VEGF	Estimula la proliferació i migració de cèl.lules endotelials augmentant la permeabilitat vascular i l'adhesió leucocitària
VEGFR, NRP-1	Integració de senyals angiogèniques i de supervivència cel.lular
Angiopoietina-1, Tie-2	Estabilització de vasos i inhibició de la permeabilitat
PDGF-BB i receptors	Recluten cèl.lules musculars llises
TGF β 1, endoglina, receptors deTGF β	Estimulen la producció de matriu extracel.lular
MCP-1, IL8, altres citoquines, FGF, HGF	Estimulen la proliferació i migració de cèl.lules endotelials
Integrines	Receptor de proteïnes de matriu extracel.lular i proteases
VE-Cadherina, CD31	Proteïnes d'unions intercel.lulars
Efrines	Regulen la diferenciació arterio-venosa
UPA, tPA, MMPS	Remodelació de la matriu, alliberació i activació de factors de creixement
PAI-1	Estabilització de neovasos
NOS, COX-2, PGE2, PGI2	Vasodilatació, inducció de factors de creixement i proliferació endotelial

Taula 2. Principals factors anti-angiogènics i les seves funcions.

INHIBIDORS	FUNCIÓ
sVEGFR, sNRP-1	Segrest de VEGF i PIGF
Angiopoietina-2	Antagonista de l'angiopoietina-1
TSP-1, 2	Inhibeix la proliferació i migració endotelial; indueix l'apoptosi d'aquestes cèl.lules
Angiostatina, endostatina i vasostatina	Inhibeixen la proliferació, supervivència i migració endotelial.
Tumstatina	Inhibeix la síntesi proteica a l'endoteli.
Fragment d'antitrombina III	Inhibeix la proliferació endotelial
Prolactina 16 Kda	Inhibeix VEGF/bFGF
PEDF	Indueix l'apoptosi endotelial
Fragment de SPARC	Inhibeix l'activitat de VEGF
Fragment d'osteopontina	Interfereix la senyalització via integrines
VEGI	Inhibeix el creixement endotelial
TIMPS, inhibidors de MMPs	Inhibeixen la remodelació de la matriu extracel.lular i la migració endotelial
15-d-PGJ2, PPAR γ , TxA2	Indueixen apoptosi, inhibeixen proliferació i migració de l'endoteli, inhibeixen l'expressió de uPA, VEGFR i incrementen la de PAI-1
PF-4, IP-10, IL-4, IL-12, IL-18, IFN	Inhibeixen la migració endotelial i l'expressió de bFGF.

En l'actualitat, es considera que el procés d'angiogènesi tumoral es desencadena com a resultat d'un desequilibri en el balanç, entre d'altres, de les molècules abans esmentades com a estimuladores i inhibidores (concepte de "switch" angiogènic)⁸. Quan aquesta proporció és baixa, l'angiogènesi tumoral està bloquejada o disminuïda; al contrari, quan aquesta proporció és alta, l'interruptor angiogènic s'encén. Resulta molt important la troballa de Dameron et al de què la pèrdua de la funció d'un tipus del gen supressor p53 resulta en una pèrdua de l'expressió de TSP^{10,11}. Aquesta troballa no solament estableix una possible associació entre les bases genètiques del càncer i l'angiogènesi tumoral. A més obre un nou camp d'investigació sobre els inhibidors endògens de l'angiogènesi. En l'actualitat està àmpliament reconegut que els oncògens, com les mutacions ras o src, poden contribuir també a l'angiogènesi mitjançant l'estimulació de la producció de molècules proangiogèniques com el VEGF. Aquests efectes han estat progressivament descoberts en el camp dels oncògens i els gens supressors tumorals, mitjançant l'ús de cultius de cèl·lules tumorals pures per estudiar les alteracions funcionals de la genètica, que indueixen el desenvolupament tumoral.

IIIb. Família VEGF

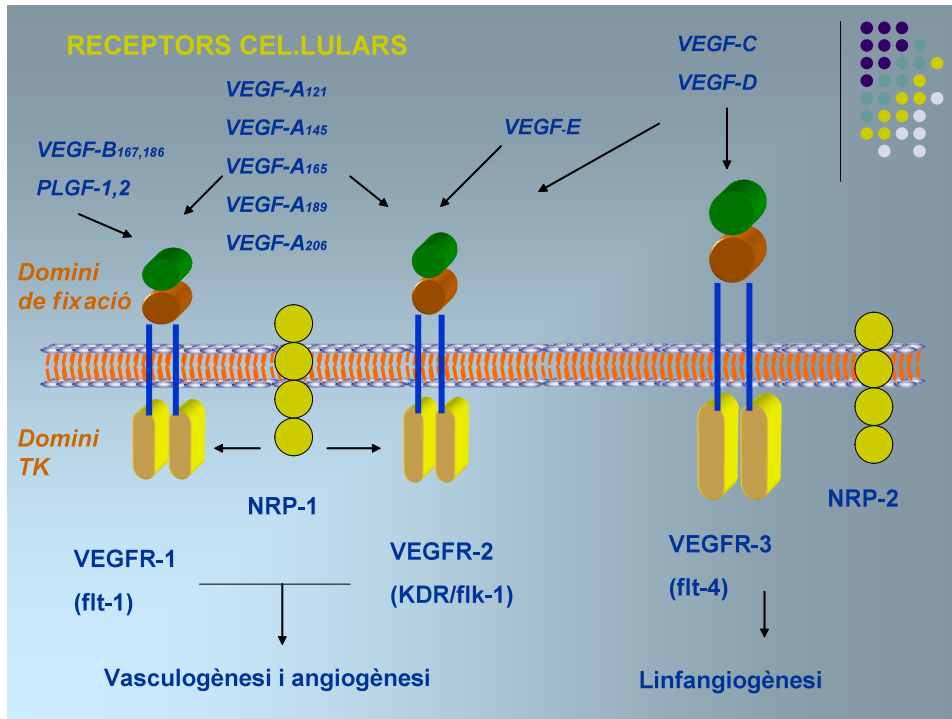
El factor estimulant del creixement de l'endoteli vascular (VEGF) juga un paper essencial en la vasculogènesi durant l'embriogènesi, l'angiogènesi fisiològica i la neovascularització tumoral. La família de VEGF inclou el VEGF-A, el factor de creixement de placentes (PIGF), VEGF-B, VEGF-C i VEGF-D. El principal membre d'aquesta família és el VEGF-A (de fet, quan es parla genèricament de VEGF en realitat palem de VEGF-A). VEGF-A és un homodímer de 40-45 kDa

alliberat per una gran varietat de tipus cel·lulars tant benignes com malignes. En funció de l'existència de diferents tipus de mRNA, es produeixen cinc monòmers de VEGF diferents de llargades d'aminoàcid variables (denminades per números de subíndex): VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189, i VEGF206¹².

La transcripció de VEGF mRNA és provocada per la hipòxia i per una gran varietat de senyals de creixement i citoquines. Les cèl·lules endotelials estimulades per VEGF migren i proliferen, augmenten la permeabilitat vascular, elaboren MMPs, es divideixen i recluten elements de suport com pericits. La vasculogènesi induïda per VEGF també ocorre indirectament. Seguint l'exposició de la cèl·lula endotelial al VEGF, es regula l'expressió de L-, M-, i β -2 integrines. Això facilita l'adherència i migració de monòcits a la cèl·lula endotelial. Aquests monòcits podrien així contribuir a l'angiogènesi mitjançant la secreció de factors de creixement i citoquines.

L'activitat de VEGF-A, es troba mediada per la interacció amb receptors tirosin-kinases d'alta afinitat (RTKs) expressats en la majoria dels cèl·lules endotelials. S'han identificat tres tipus principals de VEGF RTKs¹³: Receptor de VEGF 1 (VEGFR-1) (Flt-1), VEGFR-2 (KDR), i VEGFR-3 (Flt-4). Aquests receptors tradueixen senyals que afectaran la proliferació endotelial normal, la diferenciació, migració, i el metabolisme cel·lulars (Fig.1)

Figura 1. Receptors de la família VEGF.



- **VEGFR-1, o Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)**: és un membre de tipus III de la família de receptors tirosin quinasa. Encara que s'expressa principalment en la cèl·lula endotelial, VEGFR-1 és també present en fibres musculars llises i monòcits. L'activació d'aquest receptor per VEGF estimula la migració cel·lular i contribueix indirectament a la migració dels nous brots a través de la matriu extracel·lular realçant la producció de MMPs associades a les fibres musculars llises endotelials. La unió amb VEGFR-1 també aconsegueix el reclutament de monòcits i l'expressió de factors tissulars tant per part dels monòcits com per les cèl·lules endotelials.

- **VEGFR-2, o fetal kinase-1 (Flk-1):** és essencial per a vasculogènesi embrionària i hematopoiesi definitiva. Els ratolins deficients en VEGFR-2 moren intra-úter a causa d'un deficient desenvolupament vascular i hematopoiètic. Fora de l'època embrionària, aquest receptor s'expressa exclusivament en cèl·lula endotelial i cèl·lules indiferenciades hematopoiètiques primitives, jugant un paper en la proliferació, diferenciació, i vasculogènesi de la de cèl·lula endotelial. En tumors malignes, el VEGF que es lliga a VEGFR-2 provoca el procés de neovascularització que condueix al creixement i metàstasi dels tumors.

La unió amb VEGFR-2 promou la supervivència cèl·lular inhibint l'apoptosi a través d'un fosfatidilinositol 3'-kinasa/Akt. La inactivació de tetranitrat de pentaeritritol (PTEN) i l'estimulació del fosfatidilinositol 3' -kinasa/Akt proporciona un mecanisme per connectar la unió amb VEGFR-2 i l'activació d'integrines. La incubació de cèl·lules endotelials amb VEGF ocasiona una estimulació en la producció d'integrines i condueix a una major adhesió cel·lular, migració, i unió amb lligands solubles.

- **VEGFR-3, (Flt-4):** és el membre més recentment descrit de la família de VEGFR. Aquest receptor es restringeix predominantment a cèl·lules endotelials que estan prop dels canals limfàtics. Així doncs, el seu paper seria predominantment estimulador de la limfangiogènesi¹⁴.

Pel que fa als altres tipus de VEGF que s'han comentat abans, la seva unió als diferents receptors es dona de la següent forma^{12,14,15}:

- **VEGF-B:** té un paper important probablement en la vasculogènesi, però pot també exercir funcions tals com l'activació d'enzims invasius a les cèl·lules endotelials.

- **VEGF-C:** s'associa freqüentment amb l'angiogènesi limfàtica. Tanmateix, més recentment s'ha associat la seva expressió amb l'angiogènesi tumoral a diversos nivells. S'uneix preferentment al receptor VEGFR-3. Existeixen fins i tot estudis que relacionen la seva expressió amb metàstasis limfàtiques.
- **VEGF-D:** aquesta proteïna pot lligar-se a receptors VEGFR-2 i VEGFR-3, i sembla que pot induir angiogènesis in vivo.
- **VEGF-E:** molt poc se'n coneix en el moment actual, excepte que s'uneix al receptor VEGFR-2 i que pot induir mitosi de cèl·lules endotelials i, per tant, el fenomen de l'angiogènesi.

IIIc. Procés angiogènic

L'inici del procés angiogènic es troba reflectit en una sèrie de fets, que bàsicament són^{16,17}:

1. Alliberament de proteases per les cèl·lules endotelials activades.
2. Degradació de la membrana basal vascular preexistent.
3. Migració de cèl·lules endotelials intratumorals.
4. Prolifерació de cèl·lules endotelials.
5. Formació d'una nova membrana basal i adherència dels pericits (estabilització del nou teixit vascular).
6. Fusió dels nous vasos formats.
7. Establiment del flux sanguini dels neovasos.

El procés metastàtic és un fenomen que comparteix propietats fisiològiques i moleculars amb l'angiogènesi, i necessita de la seva col·laboració. Ambdós són processos invasors en els quals les cèl·lules (endotelials en l'angiogènesi i tumorals en la metastasi), travessen barreres biològiques (membrana basal, matriu extracel·lular i estroma amb cèl·lules i macromolècules) per assolir el seu teixit diana¹⁸. A semblança de l'angiogènesi, la disseminació metastàsica també constaria d'una sèrie d'etapes:

1. Sortida de les cèl·lules neoplàsiques del tumor primari
2. Superació de la membrana basal epitelial i de l'estroma
3. Penetració en el sistema vascular i circulació pel torrent sanguini.
4. Sortida del torrent sanguini travessant la membrana basal endotelial i l'estroma perivascular.
5. Penetració en el teixit diana.
6. Angiogènesi, proliferació cel·lular i creixement tumoral.

Va. Limfomes, mieloma i leucèmies

Encara que la importància de l'angiogènesi en els tumors sòlids s'ha reconegut ara ja fa una sèrie d'anys, la seva importància en neoplàsies hematològiques és menys clara. L'evidència suggereix que VEGF té un paper essencial en el desenvolupament i progressió de diferents tumors hematològics com les leucèmies agudes, síndromes mieloproliferatius, la mielodisplàsia, els limfomes no-Hodgkin i el mieloma múltiple^{19,20}.

Aquestes neoplàsies poden mostrar una resposta tròpica a una gran varietat de molècules autocrines i paracrines i els diferents marcadors d'angiogènesi podran

tenir importància pronòstica en algunes d'elles. Aquest apartat explora l'evidència experimental i clínica a favor de la importància del fenomen angiogènic en diferents tumors del sistema hematopoietic²¹.

- **Leucèmia mieloide aguda (LMA):** Les biòpsies de medul·la òssia de pacients amb leucèmia mieloide aguda mostren un augment de la neovascularització que és reversible després de la curació de la malaltia. En un estudi de 20 pacients amb LMA, la densitat microvascular (MVD) era significativament més gran en mostres de biòpsia de medul·la òssia de pacients no tractats que en aquells de controls normals ($p < 0.001$). A més a més, els blasts d'aquests pacients expressaven VEGF mRNA. Una anàlisi de blasts de 28 pacients amb LMA de novo i cinc pacients amb LMA secundària demostrà transcripcions de VEGF en 20 i 3 pacients, respectivament. En pacients novament diagnosticats amb els diferents tipus de LMA, hi ha una relació directa entre el contingut cel·lular creixent de VEGF i una supervivència més curta ($p = 0.01$). També s'ha observat que la manca d'una relació entre els nivells de VEGF i l'edat, citogenètica, estat general o un antecedent de desordre hematològic suggereix que aquesta mesura de potencial d'angiogènic dels mieloblasts és un predictor independent de resultat²²⁻

24.

- **Leucèmia limfàtica aguda (LLA):** en una sèrie on s'avaluava la medul·la òssia de 40 nens diagnosticats de LLA, es mostrava que la densitat microvascular era significativament més gran quan es comparava amb controls ($p < 0.0001$). En pacients adults amb LLA, el nombre mitjà de vasos sanguinis a la medul·la òssia era també significativament més alt que en medul·la normal ($p = 0.005$).

Interessantment, bFGF, una altra molècula pro-angiogènica potent, però no el VEGF, es trobava elevat al sèrum d'aquests pacients. Tanmateix, al treball de Bellamy et al. es demostrà que algunes línies cel·lulars de pacients amb LLA tenen sobre-expressió de VEGF així com també de VEGFR-1^{23,25}.

- **Leucèmia limfàtica crònica (LLC):** les cèl·lules B de la LLC produeixen VEGF biològicament actiu, tant in vitro com in vivo. Encara que al treball de Aguayo et al. no es va demostrar un augment en MVD en la medul·la òssia de pacients amb LLC, els ganglis limfàtics infiltrats per cèl·lules de LLC mostraven un augment significatiu en densitats vasculars. L'expressió de VEGFR-2 i nivells de sèrum augmentats de VEGF estan associats amb malaltia progressiva i supervivència escurçada en pacients amb LLC²³.

- **Leucèmia mieloide crònica (LMC):** la densitat microvascular de la medul·la òssia de pacients amb LMC està aproximadament dues vegades per damunt dels controls ($p= 0.003$). Això es relaciona amb la producció de VEGF en aquests pacients. Els nivells mitjans de VEGF en mostres de plasma d'aquests pacients són aproximadament tres vegades majors que aquells d'espècimens de control. La importància a nivell pronòstic d'aquests descobriments roman indefinida.

- **Limfomes no Hodgkin (LNH):** VEGF s'ha relacionat amb el curs de pacients amb aquests tipus de tumors. Per exemple, els nivells de VEGF són significativament més baixos en pacients en remissió completa després d'un seguiment mitjà de 21 mesos, comparats amb aquells amb malaltia progressiva ($p= 0.016$). A més, la supervivència lliure d'esdeveniment era significativament

més alta quan els pacients tenien nivells de VEGF que eren sota de la mediana de 147 pg/ml ($p= 0.018$). Encara que l'expressió cel·lular de VEGF és comuna en LNH, la coexpressió de receptors sembla limitada als de grau intermig o alt^{23,26-30}.

- Mieloma Múltiple: IL-6 és un factor de creixement de cèl·lules plasmàtiques. Els nivells de plasma d'IL-6 es relacionen directament amb la càrrega tumoral, destrucció òssia i unes altres mesures d'activitat en mieloma. Es considera que la font del citoquines és tant autocrina com paracrina. Sense tenir en compte el lloc d'origen, els nivells elevats d'IL-6 provoquen expressió de VEGF en la cèl·lula endotelial. Com a resultat, els nivells de VEGF s'eleva a la medul·la òssia de pacients amb mieloma múltiple i es relacionen amb l'etapa de la malaltia. VEGF també pot servir com a factor de creixement a les cèl·lules plasmàtiques malignes. Això estableix un bucle de resposta que pot contribuir a la progressió de la malaltia. Al laboratori, els anticossos anti- IL-6 reduïen el nombre de cèl·lules plasmàtiques en el cultiu cel·lular de medul·la òssia així com el nombre de cèl·lules endotelials.

Diferents estudis experimentals i clínics suggereixen que el creixement cel·lular de mielomes és dependent de proliferació de les cèl·lules endotelials dins de la medul·la òssia. Això es pot relacionar amb l'estimulació paracrina d'IL-6 així com d'altres citoquines com ara bFGF i MMPs. En pacients amb mieloma múltiple, hi ha una correlació forta entre un augment de l'angiogènesi, la densitat microvascular i la supervivència. En l'experiència de la Clínica Mayo, pacients amb < 50 microvasos/camp sobreviuen 5.1 anys, mentre aquells amb més de 50 sobreviuen només 2.6 anys ($p= 0.004$). També, el grau d'angiogènesi avaluat per examen visual semiquantitatiu de mostres de medul·la òssia, es

correlacionava amb un alt marcatge de cèl·lules plasmàtiques, un altre indicador de severitat de la malaltia²³.

- **Mielodisplàsia:** les síndromes mielodisplàsiques (MDSs) són desordres preleucèmics, especialment en pacients que presenten càrrega de leucèmia perceptible o un cariotip advers. Entre els diferents subtipus de la FAB, la densitat microvascular era significativament més alta en l'anèmia refractària amb excés de blasts en transformació en la leucèmia mielomonocítica crònica, o en els distints subtipus de fibrosi, comparats amb l'anèmia refractària amb excés de blasts, l'anèmia refractària, o l'anèmia refractària amb sideroblasts en anell. Els nivells plasmàtics de VEGF s'eleva a les mielodisplàsies en una mesura comparable a aquells pacients amb leucèmia mieloide aguda, però menys que la comunicada en leucèmia limfàtica crònica i leucèmia mieloide crònica. VEGF és expressat per elements mieloides immadurs, especialment precursors de leucèmia monocítica però no elements eritrocítics o limfocítics^{22,23}.

- **Mielofibrosi Idiopàtica:** l'angiogènesi s'augmenta a la medul·la òssia de pacients amb mielofibrosi idiopàtica. L'augment de la neovascularitat de medul·la òssia va ser observat en un 70% de 114 pacients amb aquesta malaltia. El grau de densitat microvascular era més alt que en pacients amb policitèmia vera, trombocitèmia essencial, o casos controls. Aquest augment es relacionava amb la mida de la melsa i era un factor de risc significatiu i independent per a la supervivència global. La neoangiogènesi era independent del grau de fibrosi, suggerint tot això que la neovascularització és un component integrant d'aquesta malaltia i pot oferir un objectiu per una intervenció terapèutica²³.

- **Linfoma de Hodgkin:** hi ha diversos estudis on s'ha realitzat una aproximació al possible paper que pot tenir l'angiogènesi en aquest tipus de tumor^{27,31-37}. L'estudi de Doussis-Anagnostopoulou et al.³⁸ examinava l'expressió immunohistoquímica de VEGF utilitzant l'anticòs monoclonal VG1 en una sèrie de 61 casos de pacients amb malaltia de Hodgkin, tant incloent-hi les variants de Hodgkin clàssic com la variant de predomini de limfòcits nodular, i relacionava aquests resultats amb la densitat microvascular, utilitzant un anticòs monoclonal antiCD31. En 41 casos (un 70.6%) de la variant clàssica i un dels tres casos de predomini de limfòcits nodular, les cèl·lules de Reed-Sternberg i les cèl·lules estromals expressaven VEGF. La tinció observada era citoplasmàtica, o de tipus difús o amb una distribució paranuclear focal. Els macròfags eren sempre positius, mentre que els limfòcits reactius mostraven positivitat ocasional. També es va veure una quantitat de tinció extracel·lular forta i variable, així com també s'observava una tinció intravascular prominent. No hi havia cap relació estadísticament significativa entre l'expressió de VEGF i el subtipus de la malaltia o la microdensitat vascular.

Un altre assaig important és el de Korkolopoulou et al.³⁹. El propòsit del seu estudi era avaluar diverses característiques morfomètriques de microvasos en seccions de ganglis limfàtics de 286 pacients amb limfoma de Hodgkin i investigar la seva relació amb paràmetres clínico-patològics i pronòstics. La microdensitat vascular (MDV), l'àrea vascular total (AVT) i uns quants paràmetres microvasculars eren quantificats després de la tinció amb anti-CD34 de la regió de vascularització més intensa. En l'anàlisi univariable, la supervivència global específica de malaltia era afectada de forma negativa per MVD i AVT, mentre que la supervivència lliure

de recaiguda estava associada amb la presència de més seccions de vasos. L'anàlisi multivariant revelava que l'extensió angiogènica (MVD/TVA), l'edat i el nombre de llocs afectes afectaven de forma independent la supervivència global. Un altre estudi a tenir en compte és dut a terme per Mainou-Fowler et al³¹. En el seu treball, examina la densitat microvascular, l'expressió de VEGF i del factor de creixement endotelial derivat de plaquetes (PdEGF) en biòpsies de ganglis limfàtics de pacients amb limfoma de Hodgkin tant a la fase diagnòstica com en recaiguda. La MDV i el PdEGF augmentaven durant la progressió de la malaltia en set d'entre 11 casos en el cas de MDV i en 5 de 11 per PdEGF.

Un estudi on es valora el paper d'un altre estimulador de l'angiogènesi diferent del VEGF és el de Kadin et al⁴⁰. El TGF-beta és un factor de creixement multifuncional que promou el creixement de fibroblasts, la síntesi de col·lagen, l'angiogènesi, i que estimula la migració i activació dels monòcits, però suprimeix el creixement i diferenciació de limfòcits immunes i cèl·lules "killer". Aquest treball inclou a 14 pacients amb limfoma de Hodgkin, incloent-hi: 8 esclerosi nodular, 4 cel·lularitat mixta, 1 predomini de limfòcits, i 1 tipus depleció limfoide. L'activitat de TGF-beta es demostrava en sis casos d'esclerosi nodular però no en els altres tipus histològics. La tinció d'aquest factor es trobava al citoplasma de la cèl·lula de Reed-Sternberg (RS) en un cas i a la superfície de les cèl·lules de RS i les seves variants lacunars en cinc casos. L'activitat de TGF-beta associada amb la matriu extracel·lular es localitzava principalment al voltant dels vasos sanguinis, zones de necrosi, als marges de bandes d'esclerosi de col·lagen, i en àrees sincitials de les cèl·lules de RS. En dos casos beta de TGF-beta estava associat amb histiòcits epitelials o granulomes. Els limfòcits petits, els granulòcits, i les cèl·lules centrals germinals eren arreactius. Aquests resultats suggereixen que beta de TGF-beta

és un factor de creixement d'importància biològica en LH i pot ser responsable de molts dels trets histològics, com la esclerosi nodular i els granulomes, que poden tenir importància pronòstica.

Vb. Malaltia de Hodgkin

Vb.1. Generalitats

El limfoma de Hodgkin és una malaltia on es produeix una proliferació maligna localitzada o disseminada de cèl·lules del sistema limforeticular, principalment implicant als ganglis limfàtics, melsa, fetge, i medul·la òssia. Els símptomes inclouen la presència de limfadenopaties indolores, a vegades amb febre sudoració de predomini nocturn, pèrdua de pes, pruija, esplenomegàlia, i hepatomegàlia. La diagnosi es basa en la biòpsia del gangli limfàtic. El tractament és curatiu aproximadament en un 75% de casos i consta de quimioteràpia amb o sense radioteràpia.

El limfoma de Hodgkin resulta de la transformació clonal de cèl·lules d'origen B, les quals donen lloc a la cèl·lula patognomònica d'aquesta malaltia que és la cèl·lula de Reed-Stenberg. La causa és desconeguda, però factors tant de tipus genètics com associacions mediambientals (p. ex. treballadors de la fusta; història de tractament amb fenitoïna; antecedents de tractament amb radioteràpia o quimioteràpia; infeccions pel virus d' Epstein-Barr, tuberculosi, herpes-virus 6 i el VIH) hi poden jugar un paper clau.

El risc també es troba lleugerament augmentat en persones afectes d'alguns tipus d'immunodeficiència, com ara: síndrome d'ataxia-telangiectàsia, síndrome de

Klinefelter, síndrome de Chédiak-Higashi, síndrome de Wiskott-Aldrich, malaltia celiaca i síndrome de Sjögren.

La majoria dels pacients també desenvolupen un defecte lentament progressiu de la de tipus cel·lular-T que en la malaltia avançada contribueix a l'aparició d'infeccions bacterianes comuns, fongs, virus i paràsits. La immunitat humoral (producció d'anticossos) es deprimeix en la malaltia avançada. La mort sovint resulta de fenòmens sèptics.

- **Síntomes i signes:** molts pacients debuten amb la presència d'adenopaties cervicals indolores. Encara que el mecanisme és confús, el dolor pot ocórrer en àrees malaltes immediatament després de prendre begudes alcohòliques.

Unes altres manifestacions es desenvolupen mentre la malaltia s'estén a través del sistema reticuloendotelial, generalment a llocs contigus. La prujia pot ocórrer ja des de l'inici. Els anomenats símptomes B inclouen febre, sudoració nocturna i pèrdua de pes involuntària (> un 10% del pes corporal en els 6 mesos previs), que pot indicar la implicació de ganglis limfàtics mediastínics o retroperitoneals), vísceres (fetge), o medul·la òssia. L'esplenomegàlia és sovint present; l'hepatomegàlia pot ser present. La febre Pel-Ebstein (uns quants dies de febre alta que regularment alterna amb uns quants dies o unes quantes setmanes de temperatura normal o sota normal) ocorre de forma ocasional. La caquèxia és comuna en situacions avançades.

L'afectació òssia és sovint assintomàtica, però pot produir lesions osteoblàstiques vertebrals (vèrtebres d'ivori) i, rarament, dolor amb lesions osteolítiques i fractures de compressió. Lesions a nivell intracranial, gàstriques i

cutànies són rares, i quan es presenten suggereixen l'associació del limfoma amb la infecció per VIH.

La compressió local per masses tumorals sovint provoca símptomes, incloent-hi: icterícia secundària a obstrucció de conductes biliars, edema d'extremitats inferiors secundari a una obstrucció limfàtica a la pelvis o a nivell engonal, dispnea severa secundària a compressió de l'arbre traqueobronquial, cavitació o abscessos pulmonars secundaris a infiltració del parènquima pulmonar (que pot simular una consolidació lobar o broncopneumònia), invasió epidural que pot ocasionar una paraplègia, síndrome de Horner i neuràlgia per compressió d'arrels nervioses.

IVb.2. Diagnòstic

El procés diagnòstic del pacient amb sospita de malaltia de Hodgkin, inclou les següents exploracions complementàries:

- 1. Rx de tòrax.
- 2. TC cervico- toraco-abdominal.
- 3. Hemograma amb recompte cel·lular i VSG. Bioquímica general amb LDH, transaminasses i albuminèmia.
- 4. Biòpsia ganglionar.
- 5. Biòpsia de moll d'os.
- 6. PET.

Normalment la sospita d'un limfoma de Hodgkin es dona davant de pacients amb adenopaties indolores o masses mediastíniques detectades en radiografies de tòrax rutinàries. Adenopaties similars es poden donar a la mononucleosi

infecciosa, toxoplasmosi, infecció per citomegalovirus, limfoma no-Hodgkin, leucèmia, càncer de pulmó, sarcoïdosi, o tuberculosi.

La biòpsia del gangli, mostrarà la presència de cèl·lules de Reed-Sternberg (cèl·lules grans i binucleades) dins un característic infiltrat cel·lular heterogeni format per histiòcits, limfòcits, monòcits, cèl·lules plasmàtiques, i eosinòfils.

IVb.3. Tipus histològics

El limfoma de Hodgkin clàssic té 4 subtipus histopatològics (veure Taula 3). Hi ha també un subtipus nodular de predomini limfocític. Certs antígens determinats a les cèl·lules de Reed-Sternberg poden ajudar a diferenciar el limfoma de Hodgkin del limfoma no-Hodgkin, i el limfoma de Hodgkin clàssic del tipus predomini limfocític⁴¹.

Taula 3.

Limfoma de Hodgkin (Classificació de la WHO)

Tipus Histològic	Aspecte morfològic	Immunofenotip	Incidència
Classic			
Esclerosi Nodular	Teixit fibrós i dens envoltant els ganglis de Hodgkin	CD15 ⁺ , CD30 ⁺ , CD20 ⁻	67%
Cel·lularitat Mixta	Nombre moderat de cèl·lules de Reed-Sternberg amb un infiltrat mixt	CD15 ⁺ , CD30 ⁺ , CD20 ⁻	25%

Predomini Limfocític Poques cèl.lules de Reed- CD15⁺, CD30⁺, 3%
Sternberg . Moltes cèl.lules B .Poca CD20⁻
esclerosi

Depleció Limfoide	Moltes cèl.lules de Reed- Sternberg .Fibrosi extensa	CD15 ⁺ , CD30 ⁺ , CD20 ⁻	Rar
-------------------	--	---	-----

Nodular de predomini limfocític

	Poques cèl.lules neoplàsiques (limfòcits o histiòcits o ambdúes) Moltes cèl.lules petites tipus B .Patró nodular	CD15 ⁻ , CD30 ⁻ , CD20 ⁺ , EMA ⁺	3%
--	---	--	----

La limfopènia pot ocórrer de forma inicial i empitjorar així com avança la malaltia. L'eosinofília és present en un 20% dels pacients i la trombocitosi també es pot donar. L'anèmia, sovint microcítica, normalment es desenvolupa en la malaltia avançada. En aquesta anèmia, la reutilització defectuosa de ferro es caracteritza per una siderèmia baixa, una capacitat de fixació del ferro baixa i un ferro augmentat a la medul·la òssia. La pancitopènia és ocasionalment provocada per la invasió de la medul·la òssia i normalment es veu en el subtipus de depleció limfoide.

L'elevació dels nivells de fosfatasa alcalina presents no indica sempre l'afectació de la medul·la òssia o del fetge. Els augments de fosfatasa alcalina leucocitària, haptoglobina, VSG i altres reactants de fase aguda normalment reflecteixen malaltia activa.

- **Estadiatge**: després del diagnòstic, serà l'estadiatge de la malaltia el que guii la teràpia que es seguirà. El sistema d'estadificació Ann Arbor és el comunment utilitzat. Incorpora símptomes; descobriments de l'examen físic; resultats de proves d'imatge, incloent-hi la radiografia de tòrax, TC de tòrax, abdomen, i pelvis i la biòpsia de medul·la òssia unilateral. La modificació de Cotswold del sistema Ann Arbor incorpora les implicacions pronòstiques de masses "bulky" i de l'afectació de múltiples localitzacions (veure taula 4).

Modificació Cotswold del sistema d'estadiatge Ann Arbor.

Estadiatge	Criteris
I	Afectació d'una única àrea ganglionar
II	≥ 2 regions ganglionars en el mateix costat del diafragma
III	Ganglis limfàtics , melsa , o ambdúes localitzacions per damunt i davall del diafragma
IV	Afectació extranodal (ex, moll d'os, pulmó, fetge)

La subclassificació E indica l'afectació extranodal adjacent a un gangli limfàtic afectat (p. ex., la malaltia ganglionar mediastínica amb afectació adenopàtica hiliar i amb infiltració del pulmó adjacent es classifica com un estadiatge IIE). Els

estadiatges també es poden classificar en A o B per indicar la presència o l'absència de símptomes sistèmics (pèrdua de pes, febre, o sudoració nocturna). Els símptomes sistèmics normalment es donen en estadiatges avançats (en III i IV fins un 20 a 30% de pacients). El sufix X s'utilitza per denotar malaltia voluminosa, que és > 10 cm de màxima dimensió o implica $> 1/3$ del diàmetre del tòrax (vist per radiologia simple).

IVb.4. Factors pronòstics

Els criteris pronòstics per valorar el risc de recaiguda i com a conseqüència d'això per establir tractaments de diferent agressivitat, no poden limitar-se actualment als estadis clínics. Per tal motiu han sorgit en els últims anys noves variables amb implicacions pronòstiques en el limfoma de Hodgkin, que poden ser classificades segons la relació que mantenen amb el pacient, el procés o el tractament i la resposta al mateix.

Les taules 5 i 6 recullen els grups pronòstics de l'EORTC i del grup alemany per als estadis precoços:

Taula 5: Criteris de l'EORTC per a estadis precoços.

Favorable
<p>Compleix tots els següents criteris:</p> <p>Estadi clínic I o II d'Ann Arbor</p> <p>Màxim de tres àrees afectes.</p> <p>Edat menor de 50 anys.</p> <p>VSG menor de 50 sense símptomes B o menor de 30 amb símptomes B.</p> <p>Relació mediastí/tòrax menor de 0,35</p>

Desfavorable
<p>Presència d'almenys un dels següents criteris:</p> <p>Estadi II amb almenys 4 àrees ganglionars afectes.</p> <p>Edat >50 anys</p> <p>VSG>50 en pacient asimptomàtic o de 30 amb símptomes B</p> <p>Relació mediastí/tòrax major de 0,35.</p>

Taula 6: Criteris del grup alemany d'estudi de la malaltia d'Hodgkin per als estadis precoços.

A. Pronòstic molt favorable
<p>Compleix tots els següents criteris:</p> <p>Estadi clínic I-A</p> <p>Sexe femení</p> <p>Edat menor de 40 anys.</p> <p>Predomini limfocític o esclerosi nodular</p> <p>Relació mediastí/tòrax menor de 0,35</p>

B. Pronòstic favorable
<p>Situacions entre la A i la C.</p>

C. Pronòstic desfavorable

Relació mediastí/tòrax major de 0,35

Tres o més àrees ganglionars afectes.

Afectació esplènica massiva

VSG elevada com en els criteris de la EORTC

En 1998 Hasenclever⁴² va recollir les dades clíniques de 5.141 pacients de 25 centres. Tots els pacients eren estadis avançats. El 75% havien estat tractats amb esquemes que incloïen adriamicina i el 20% amb esquemes tipus MOPP. El tractament s'havia administrat entre els anys 1983 i 1992. La gran majoria dels pacients havien rebut ABVD, MOPP/ABVD o esquemes híbrids. Després de l'anàlisi multivariant, van recollir 7 factors amb un valor pronòstic independent similar, que van ser: la taxa d'albumina menor de 4, la taxa de Hb inferior a 10,5 gr, el sexe masculí, l'edat igual o superior a 45 anys, l'estadi IV d'Ann Arbor, la leucocitosis superior a 15.000 i la linfocitopènia inferior a 600 o menor del 8% dels leucòcits totals o ambdós (taula 7).

Taula 7.

Nº de Factors	% de pacients	SLP	SG
0	7	84%	89%
1	22	77%	90%
2	29	67%	81%
3	23	60%	78%
4	12	51%	61%
5 o més	7	42%	56%

L'índex d'Hasenclever és significatiu quan s'utilitza el COPP/ABVD i no ho és quan s'utilitza el BEACOPP o el BEACOPP intensificat. D'altra banda, sabem que si utilitzem aquest últim esquema, molts pacients seran sobretractats i exposats a efectes tòxics no menyspreables.

En 2001 Josting⁴³ va tractar d'identificar factors pronòstics després de la recaiguda de la malaltia d'Hodgkin. Per a això, va analitzar els resultats del tractament de 422 recaigudes que s'havien produït entre els anys 1988 i 1999. La distribució de les 422 recaigudes era la següent: 107 recaigudes després de radioteràpia, 133 després de tractament combinat i 182 després de quimioteràpia i radioteràpia de zones tumorals. La mitjana de seguiment dels pacients després de la recaiguda va ser de 45 mesos i l'anàlisi estadístic va identificar com a variables pronòstiques independents: la durada de la resposta prèvia (major d'un any), l'estadiatge III/IV en el moment de la recaiguda i l'anèmia (Hb menor de 12 g en l'home i de 10,5 gr en la dona).

Als quatre anys, els que tenien els tres factors desfavorables, la supervivència lliure de fracàs terapèutic i la supervivència global van ser del 17% i el 27% respectivament, mentre que les esmentades xifres van ser del 48% i 83% en el grup de pacients sense algun dels tres.

El mateix autor va analitzar durant el mateix període els resultats terapèutics d'un grup de 206 pacients en qui havia fracassat el tractament inicial. Van considerar fracàs terapèutic a l'absència de resposta o bé a la instauració d'una resposta de menys de tres mesos de durada. La mitjana d'edat dels pacients era de 34 anys. Dels 206 pacients, 57 (29%) estaven en estadi intermedi i 149 (72%) en estadi avançat.

En quant al tractament administrat, 153 (74%) van rebre quimioteràpia, 70 autotrasplantament, 47 (23%) radioteràpia i 6 (3%) no van rebre tractament per la ràpida progressió de la malaltia.

La supervivència lliure de la segona progressió i la supervivència global als cinc anys van ser del 17% i del 26% respectivament. En el cas de l'autotrasplantament, aquestes xifres van ser del 31% i 43%. L'anàlisi multivariant va identificar com a factors pronòstics un índex de Karnofsky menor de 90, l'edat per damunt de 50 anys i l'absència d'un cert grau de resposta amb el primer tractament. Als cinc anys, la supervivència dels pacients que no tenien cap factor pronòstic va ser del 55%, davant el 0% en els que tenien els tres factors.

IVb.5. Tractament

L'elecció de la modalitat de tractament és complexa i depèn de l'estadiatge de la malaltia.

Els estadiatges inicials (IA, IIA, IB, o malaltia d'IIB) es tracten generalment amb un règim de quimioteràpia abreujat de doxorubicina (adriamicina), bleomicina, vinblastina, i dacarbazine (ABVD) més radioteràpia, o bé amb un esquema de quimioteràpia més llarg sense radioteràpia. Aquests tractaments curen aproximadament a un 80% dels pacients. En pacients amb malaltia mediastínica voluminosa, la quimioteràpia pot ser de duració més llarga o d'un tipus diferent, i la radioteràpia s'utilitza rutinàriament.

L'estadiatge IIIA es tracta normalment amb quimioteràpia esquema ABVD. La irradiació del camp afecte a vegades és també utilitzada. S'han aconseguit índexs de curació d'un 75 a 80%.

Per estadiatges IVA i IVB, la quimioteràpia esquema ABVD és el règim estàndard, produint remissió completa en un 70 a 80% de pacients; més del 50% romanen lliures de malaltia als 5 anys. Uns altres medicaments eficaços inclouen nitrosourees, ifosfamida, cisplatí, carboplatí i etopòsid.

Una combinació prometedora es la de Stanford V, que consisteix en un règim de 12 setmanes de quimioteràpia que incorpora la radioteràpia de la zona afecta per a la consolidació. El trasplantament autòleg s'hauria de considerar per a tots els pacients amb limfoma de Hodgkin en recaiguda o refractari que responen a quimioteràpia de rescat o fins i tot en situació de progressió després de rescat, però amb uns pitjors resultats.

- Seguiment: els controls rutinaris es fan per identificar la possible recurrència de la malaltia. Com esquema de seguiment, proposem veure la taula 8.

Taula 8. Seguiment del Limfoma de Hodgkin

Avaluació	Freqüència
Història clínica, examen físic, hemograma (amb VSG) y bioquímica.	Els 2 primers anys cada 3 - 4 mesos Anys 3 a 5, cada 6 m. > 5 anys, cada 12 m.
Radiografia de tòrax a cada visita si no s'ha fet TC toràcica.	Els primers 2 anys cada 3 mesos Anys 3 a 5, cada 6 m.> 5 anys, anualment
TC toràcica	Els 2 primers anys cada 6 - 8 mesos Anys 3 a 5, anualment.>5 anys, si la radiologia simple de tòrax no es considera normal.

Avaluació	Freqüència
TC d'abdomen i pelvis	<p>Estadiatges I i II durant els primers 5 anys anualment.</p> <p>Per altres estadiatges els primers 2 anys cada 6 mesos.</p> <p>Anys 3 a 5, anualment.</p>
Hormones tiroides	Cada 6 mesos després de la irradiació del coll.
Mamografia	<p>Anualment començant 7 anys després de la radioteràpia si l'edat de la pacient quan va rebre irradiació de l'àrea supradiafragmàtica era < de 30 anys.</p> <p>Anualment començant als 37 anys després de la radioteràpia si l'edat de la pacient quan va rebre irradiació de l'àrea supradiafragmàtica era >= de 30 anys.</p>
RMN de mama	Malaltes d'alt risc (si l'edat de la pacient quan va rebre irradiació de l'àrea supradiafragmàtica era < de 30 anys) s'alterna cada 6 mesos amb la mamografia.

TREBALL DE RECERCA

V. Resum

Les cèl·lules de Reed-Stenberg (HRS), del limfoma de Hodgkin (LH), expressen VEGF i els seus receptors. Tanmateix, el paper pronòstic de l'angiogènesi i l'expressió de VEGF en HL no és clar. En aquest treball hem volgut investigar el valor pronòstic de l'expressió immunohistoquímica de VEGF en una nombrosa població (n=252), de pacients amb LH i tractats de forma uniforme. Un 35% d'aquests pacients mostraven un grau de tinció dèbil per VEGF, un 7% tenien de forma intensa mentre que per un 58% la tinció era nul·la. Les recaigudes eren significativament més altes en pacients amb una tinció de VEGF positiva en les cèl·lules HRS d'una manera dependent del grau de tinció. Les variables que independentment influïen en la supervivència lliure de progressió (PFS) eren una tinció de les cèl·lules HRS per VEGF positiva, IPS>2 i el fet de no haver rebut tractament amb radioteràpia. En la nostra sèrie aquest fet només influïa en quant a la supervivència global (OS) en els casos de tinció intensa. Això podria implicar que aquests casos positius de VEGF puguin respondre a tractaments de rescat i puguin necessitar d'una teràpia d'inducció més intensiva. Aquests resultats també justifiquen el desenvolupament d'assajos clínics incloent-hi fàrmacs antiVEGF o d'altres medicaments amb efecte antiangiogènic com part dels règims terapèutics en aquesta patologia.

VI. Hipòtesis de treball

Els processos angiogènics a nivell dels diferents tumors sòlids i la seva importància en quant al desenvolupament neoplàsic i pronòstic clínic dels malalts, ha estat ampliament investigat durant els darrers anys. Aquest fet a dut a incorporar com

una eina més dins l'arsenal terapèutic actuals els anomenats fàrmacs antiangiogènics. En el cas de les neoplàsies d'origen hematològic i en el limfoma de Hodgkin en particular, tant l'angiogènesi com els processos inflamatoris relacionats amb el microambient peritumoral poden ésser aspectes importants no totalment explorats en l'evolució d'aquests pacients, de manera que podrien constituir factors pronòstics útils així com convertir-se en potencials dianes terapèutiques en el maneig clínic d'aquesta patologia.

VII. Objectius

En aquest treball, ens hem plantejat com a objectius els següents aspectes:

- 1. Analitzar la influència de l'expressió del VEGF (en biòpsies ganglionars fetes al diagnòstic), sobre la resposta al tractament en una població de pacients amb LH uniformement tractada.
- 2. Analitzar la influència de l'expressió del VEGF (en biòpsies ganglionars fetes al diagnòstic) sobre la incidència de recaigudes, la supervivència lliure de progressió i la supervivència global en una població de pacients amb LH uniformement tractada.
- 3. Valorar, en funció dels apartats anteriors, la possibilitat d'introduir dins l'arsenal terapèutic actual d'aquesta malaltia i en el contexte d'assajos clínics els diferents fàrmacs existents que es relacionen amb els mecanismes de control de l'angiogènesi i del microambient peritumoral.

VIII. Introducció

El VEGF és un factor regulador clau de l'angiogènesi tumoral així com un inductor del creixement i del desenvolupament de les metàstasis en diferents neoplàsies⁴⁴⁻⁴⁷. Una sèrie de treballs han demostrat que la regulació per increment d'aquest factor, tant a nivell de mRNA com a nivell de proteïna es correlaciona amb estadiatges avançats en certs tumors i a nivell pronòstic en uns quants desordres limfoproliferatius com ara el mieloma múltiple o els limfomes no Hodgkin⁴⁸.

A més de les seves propietats angiogèniques, el VEGF també té un paper directe en el desenvolupament de les cèl·lules limfoides, l'hematopoiesi i pot facilitar tant el creixement tumoral com els fenòmens d'escapada immune^{48,49}. S'ha vist que tant el VEGF com els seus receptors s'expressen en els limfomes, suggerint un paper potencial per a la senyalització autocrina mediada per el VEGF en aquesta patologia^{50,51}. Hi ha també evidència que les cèl·lules HRS expressen VEGF i el seus receptors^{26,32}.

Tanmateix, el paper que juguen l'angiogènesi i l'expressió de VEGF en el LH no és clar. Un marcador angiogènic com és la densitat microvascular (MDV) no es relaciona clarament ni amb el control de la malaltia ni amb la progressió⁵². Els nivells elevats de VEGF en sèrum s'han descrit com un factor pronòstic desfavorable en el LH, disminuint després d'un tractament eficaç. L'evidència preliminar suggereix que l'expressió de VEGF es podria relacionar amb una pitjor evolució dels pacients amb LH²⁹. El nostre propòsit ha estat l'analitzar aquesta qüestió en una sèrie gran de pacients i uniformement tractada.

IX. Material i mètodes

- **Pacients:** de forma retrospectiva hem inclòs 252 pacients uniformement tractats amb ABVD (3-6 cicles, en funció de factors clínics) amb o sense radioteràpia (s'excloïen règims més o menys intensius). Totes les mostres es recollien amb la col·laboració de la Xarxa Nacional Espanyola de Bancs de Tumors, coordinada pel Centre Nacional d'Investigació en Oncologia (CNIO), seguint els procediments tècnics i ètics de la xarxa, incloent-hi els processos d'anonimització. L'aprovació es va donar des de la junta institucional del CNIO. El consentiment informat es va obtenir en tots els casos.

Tots els pacients es tractaven amb intenció curativa, les mostres pretractament eren adequades i la informació sobre l'estadiatge i els factors pronòstics clínics principals estaven disponibles. Basats en aquesta informació, el resultat de l' IPI (international prognostic score), podia ser determinat en tots els pacients. L'avaluació de la resposta al tractament i el seguiment es basava en els criteris de Cheson.

- **Disseny del TMA (Tissue Microarray):** utilitzàrem el mecanisme Beecher Instrument, Silver Spring, MD) per construir els TMAs. Tots els casos de HL es revisaven de manera histològica i les àrees més riques de cèl·lules de H/RS es marcaven als blocs de parafina. En cada cas, seleccionàvem 2 cilindres de teixit d' 1mm de diàmetre; els cilindres eren de 2 àrees diferents i s'incloïen junt amb controls diferents per assegurar la qualitat, reproduïbilitat i tinció homogènia de les mostres. Així, els diferents blocs de TMA es construïen, contenint cadascun

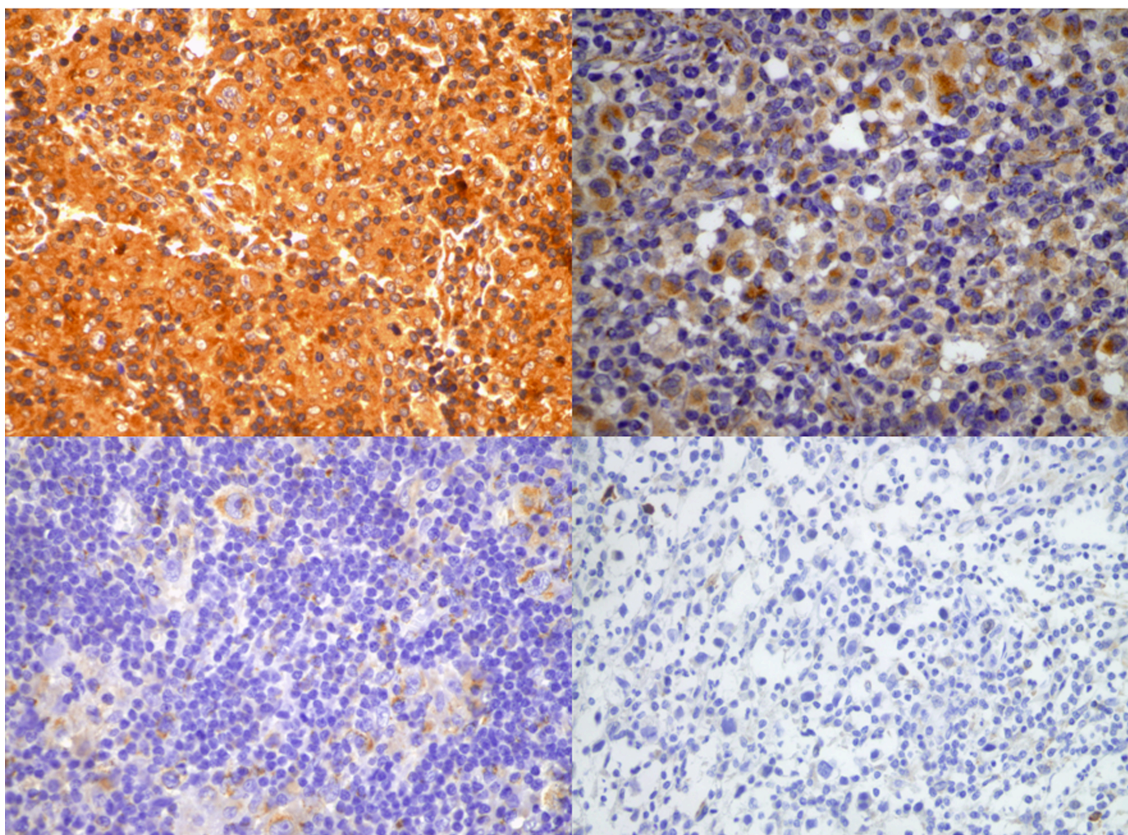
120-140 cilindres (veure figura 2). Inclòs en cada TMA hi havia una mostra de teixit limfoide reactiu d'amígdala.

- **Immunohistoquímica:** els blocs de TMA eren tallats amb un gruix de 3 µm i s'assecaven durant 16 hores a 56°C abans d'eliminar-los la cera amb xilè, rehidratant amb etanol i rentant amb fosfat salí. La recuperació de l'antigen s'aconseguia mitjançant un tractament de calor en una cuina de pressió durant 2 minuts en 10 mM de citrat (pH 6.5). Abans de tenyir les seccions, es va bloquejar la peroxidasa endògena.

La tinció d'aquestes mostres per VEGF es va fer amb l'anticòs monoclonal *abcam Ab27620* (clon monoclonal de ratolins SP28). Després de la incubació, la detecció es dugué a terme amb l'equipament EnVision FLEX.Ph High (DAKO), emprant com a substrat el cromogen de diaminobenzidina. Les seccions es contrastaven amb hematoxil.lina.

La tinció de les seccions dels TMAs era avaluada per un patòleg de referència en aquest tipus de patologia, utilitzant criteris uniformes. Per garantir la reproducibilitat d'aquest mètode, decidírem emprar criteris clars i definits. El patró de tinció de VEGF s'enregistrava com a positiu (dèbil o intens) o negatiu; el resultat positiu té en compte l'expressió citoplasmàtica/membranosa de l'anticòs en >10% de les cèl·lules de RS: positivitat baixa d'expressió en >10-50% de les cèl·lules de RS i positivitat alta en l'expressió de >50% de les cèl·lules de RS (veure figura 2).

Figura 2. Criteris uniformes per l'avaluació de la tinció de VEG.



Superior i esquerra: positivitat 2+/intensa: expressió citoplasmàtica intensa de VEGF a tota la cèl·lula HRS. Tinció estromal intensa i difusa. Superior i dreta: positivitat /2+ intensa o mitjana de VEGF a citoplasma/membrana en >50% de les cèl·lules de HRS. No hi ha tinció estromal. Abaix i esquerra: positivitat /1+ dèbil: expressió citoplasmàtica dèbil de VEGF en 10 %-< 50% de les cèl·lules de HRS. No hi ha tinció estromal; Abaix i dreta: negativa /0+: cap expressió de VEGF o positivitat dèbil en <10% de les cèl·lules de HRS.

X. Resultats

- **Característiques dels pacients:** L'edat mitjana era de 33 anys (10 a 84); un 52% eren homes (132 pacients), i un 48% dones. En quant a la distribució en funció dels diferents subtipus histològics, era de la següent manera: un 61% esclerosi nodular, un 31% cel·lularitat mixta, un 4% predomini limfocític i un 3% deplecció limfoide. Els principals factors pronòstics en el moment del diagnòstic, eren: un 41% dels pacients es presentaven en estadis III-IV d'Ann Arbor (AA),

un 40% presentaven símptomes B, un 30% tenien malaltia voluminosa, un 9% un ECOG més alt que 1 i un 26% dels casos un IPS major de 2. 130 pacients (un 52%) varen ésser tractats a més de quimioteràpia (esquema ABVD), amb radioteràpia.

- **Expressió de VEGF:** la tinció de VEGF en les cèl·lules de HRS es donava de la següent manera: 88 pacients (un 35%) mostraven una tinció d'intensitat dèbil, 17 pacients (un 7%) presentaven un grau de tinció considerat intens, mentre que en 147 casos (un 58%) no hi havia tinció. Es va observar la tinció del teixit estromal al voltant cel·lular només en 22 casos (un 9%). Considerant les diferents variables clíniques, la tinció de VEGF es relacionava només amb l'IPS, de manera que un 38% i un 53% dels pacients amb un IPS 0-2 i un IPS>2 respectivament eren VEGF positius ($p=0.029$). La positivitat del VEGF en les cèl·lules estromals no es correlacionava amb cap variable clínica.

Anàlisi de supervivència: amb una mitjana de seguiment de 58 mesos (8-199), hi ha 210 pacients vius (un 83%) i 52 en recaiguda (un 21%). La supervivència global (OS), i la supervivència lliure de progressió a 5 anys eren un 84% (79-89) i un 70% (64-76), respectivament. La majoria dels pacients ($n=221$; un 88%) aconseguiren una resposta completa (CR) amb el tractament d'inducció mentre que en 31 casos (un 12%) s'obtingué una resposta menor. Les causes de mort ($n=42$) es distribuïen de la següent forma: limfoma ($n=34$; un 81%), toxicitat ($n=5$; un 12%) i de causa no coneguda ($n=3$; 7%). L'anàlisi univariant de PFS i d'OS identificava sis factors pronòstics clínics adversos: edat >60 anys, estadis III-IVd' AA, ECOG PS > 1, símptomes B, IPS > 2 i el no haver rebut tractament amb radioteràpia (veure taula 9).

Taula 9. Anàlisi de supervivència lliure de progressió i global.

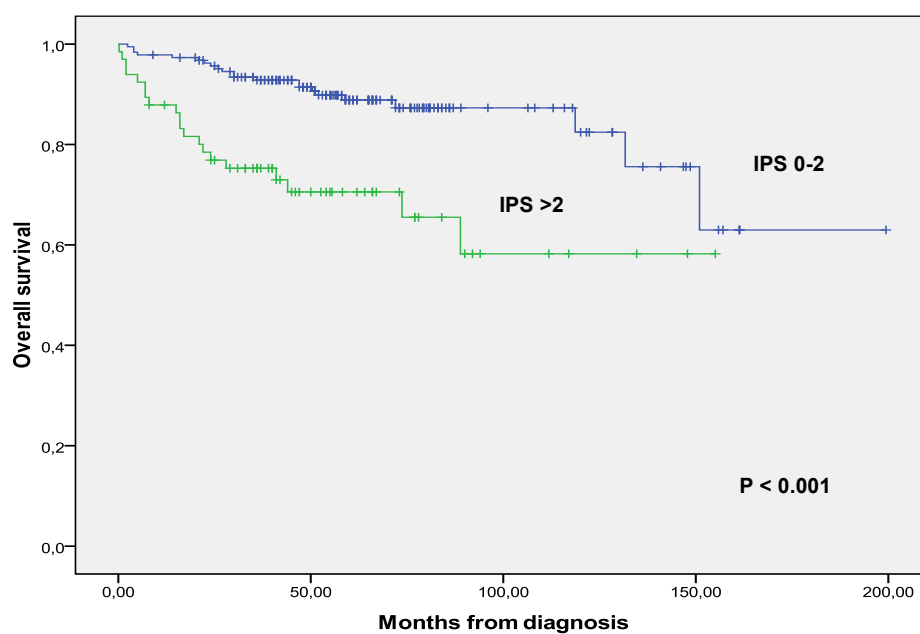
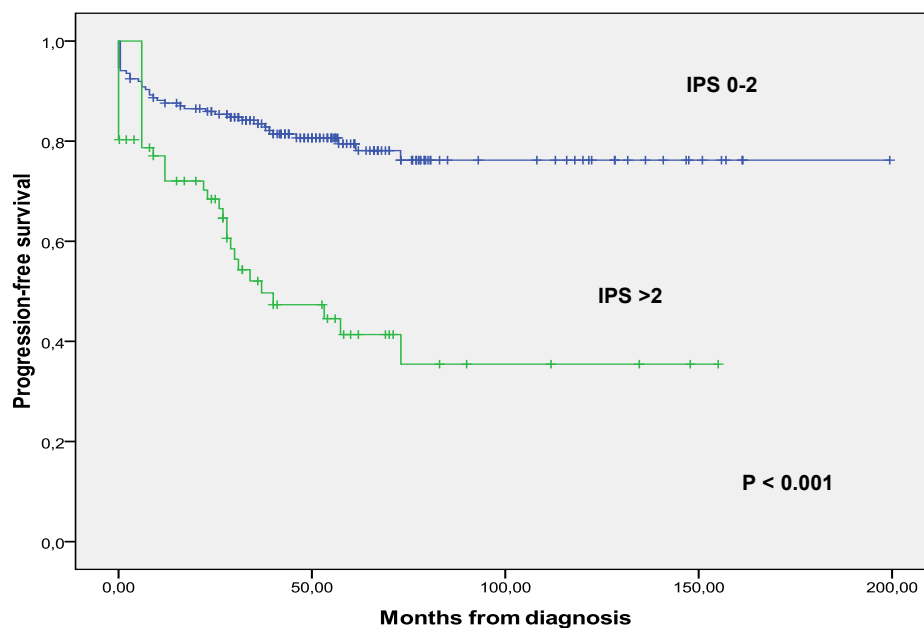
Anàlisi Univariant				
Factor	5-anys PFS (95% CI)	p	5-anys OS (95% CI)	P
Edat		0.0093		<0.001
0-59	73% (66-80)		89% (84-94)	
≥ 60	56% (39-65)		60% (44-76)	
Edat		0.0668		0.001
0-45	73% (66-80)		88% (83-93)	
>45	62% (49-75)		73% (62-84)	
Sexe		0.72		0.73
Home	70% (62-78)		84% (77-91)	
Dona	70% (60- 79)		84% (77-91)	
Massa Bulky		0.30		0.63
Si	63% (51-75)		85% (76-94)	
No	73% (66-80)		84% (78-90)	
Síntomes B		<0.001		0.004
No	81% (75-87)		89% (84-94)	
Si	53% (41-65)		76% (67-85)	
Estadi d'AA		0.003		0.011
I-II	79% (72-86)		90% (85-95)	
III-IV	57% (46-68)		76% (67-85)	
ECOG PS		0.004		<0.001
0-1	73% (67-79)		87% (82-92)	
2-4	40% (16-64)		50% (24-76)	
IPS		<0.001		<0.001
0-2	79% (73-85)		89% (84-94)	
3-7	41% (27-55)		70% (58-82)	
Radioteràpia		0.002		0.009
SI	78% (70-86)		91% (86-96)	
No	63% (54-72)		76% (67-85)	
Tinció de VEGF HRS		0.001		0.57
Positiva	57% (47-67)		80% (72-88)	
Negativa	81% (74-88)		87% (81-93)	

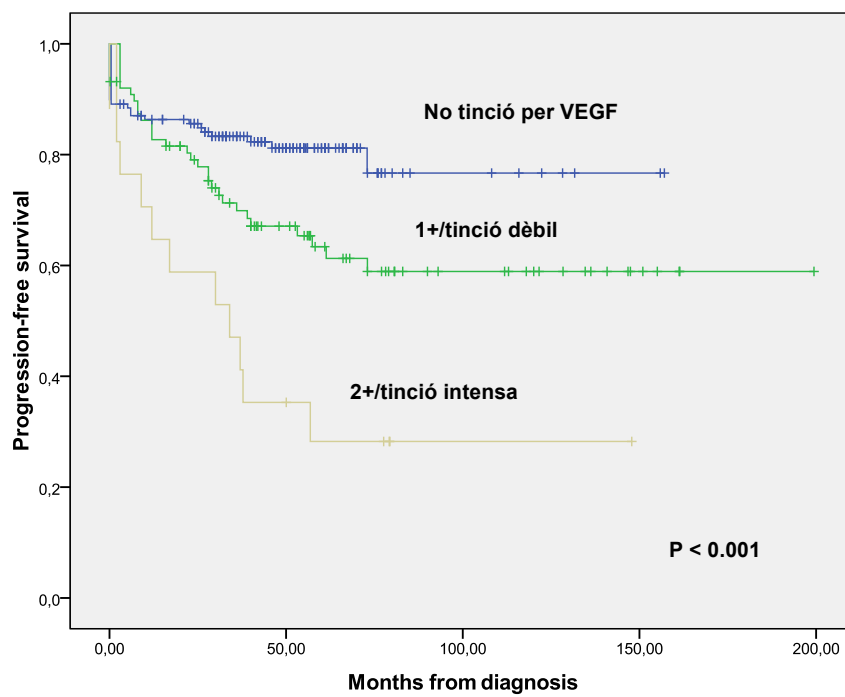
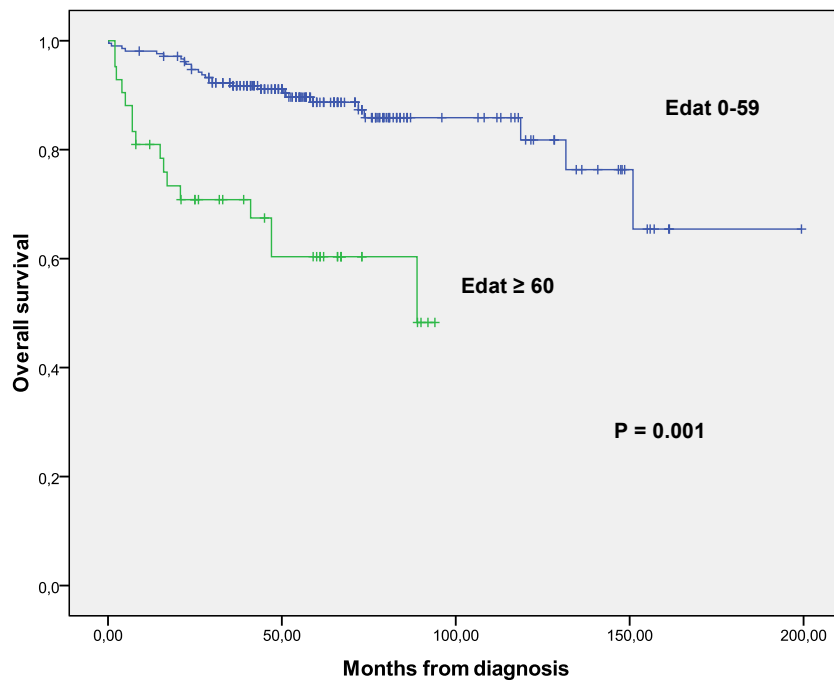
Tinció de VEGF HRS		<0.001		0.13
No	81% (74-88)		87% (81-93)	
1+/positivitat dèbil	63% (52-74)		84% (76-92)	
2+/positivitat intensa	28% (6-50)		61% (36-86)	
Tinció estromal de VEGF		0.42		0.48
Positiva	72% (50-93)		80% (62-98)	
Negativa	71% (64-77)		85% (79-90)	
Anàlisi Multivariant				
	PFS		OS	
Factor	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	P
IPS 3-7	2.57 (1.54-4.29)	<0.001	4.04 (2.06-7.92)	<0.001
VEGF positiu	3.20 (1.58-6.49)	0.004	---	---
Radioteràpia	0.59 (0.35-0.98)	0.044	---	---
Edat > 60 anys	---	---	2.87 (1.32-6.24)	0.008
ECOG PS > 1	---	---	2.05 (1.04-4.04)	0.037

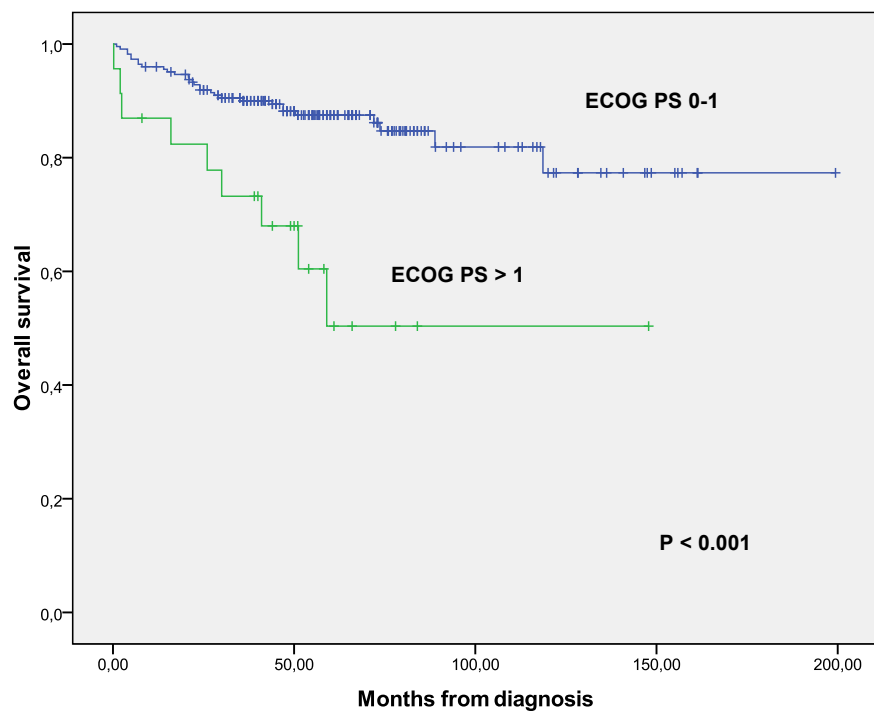
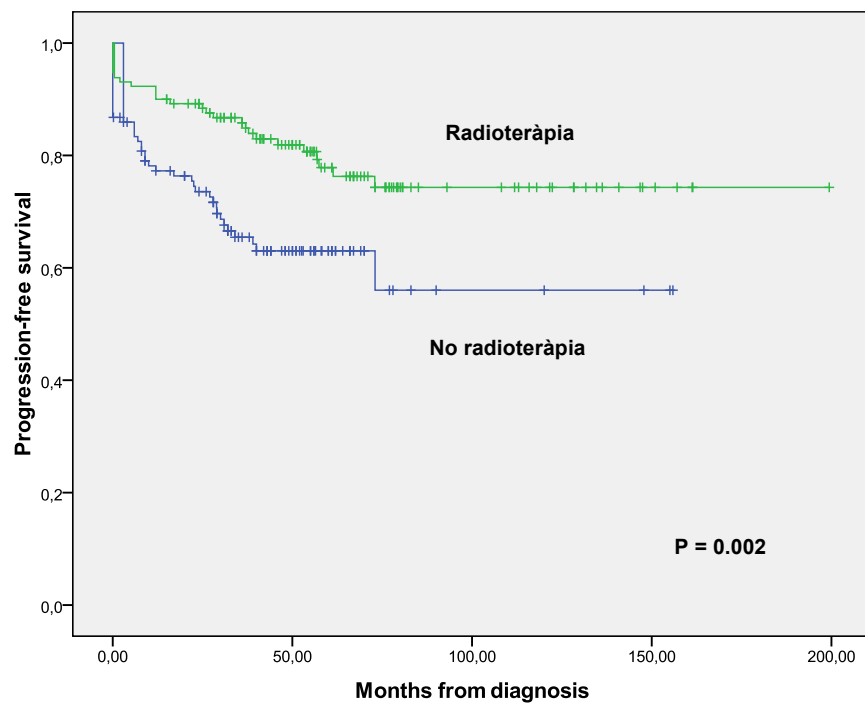
Els pacients amb una tinció intensa de VEGF presentaven índexs més baixos de CR en comparació amb pacients o bé que no tenien o bé que presentaven una tinció dèbil: un 71% contra un 89% ($p=0.026$), respectivament. Les recaigudes eren significativament més altes en pacients amb una tinció de VEGF positiva d'una manera dependent del grau de tinció (absència de tinció: 10%; 1+/positivitat dèbil: un 44% i 2+/positivitat intensa: un 65%) ($p<0.001$). Els pacients amb VEGF positiu també tenien una PFS a 5 anys significativament pitjor (absència de tinció: 81%; 1+/positivitat dèbil: un 63% i 2+/positivitat intensa: un 28%; $p<0.001$) amb només l'impacte a la OS de 5 anys en pacients amb 2+/positivitat intensa (absència de tinció: 87%; 1+/positivitat dèbil: 84%; 2+/positivitat intensa: un 61%), suggerint que la majoria de pacients que recauen amb tinció positiva dèbil de VEGF responen a un tractament de

rescat. Per l'anàlisi multivariant només l'IPS (HR 2.57), la tinció positiva de VEGF en les cèl·lules de HRS (HR 3.2) i el tractament amb radioteràpia (HR 0.59) s'associaven de forma independent amb la PFS. Veure figura 3.

Figura 3. Variables pronòstiques independents per PFS i OS.







XI. Discussió

Aquest treball retrospectiu on es presenten les dades d'una gran sèrie de pacients amb LH uniformement tractats, mostra que el VEGF en les cèl·lules de HRS té un impacte tant en el control de malaltia com en la recaiguda. De fet, aquesta observació podria tenir dues explicacions. En primer lloc, el VEGF és un regulador clau de l'angiogènesi, essencial pel creixement tumoral. Alhora, l'angiogènesi mediada per la producció tumoral de VEGF ocasionaria una vascularització aberrant tumoral, de manera que aquests nous vasos desorganitzats reduirien l'arribada del tractament farmacològic i, per tant, la resposta tumoral. Unes altres sèries petites recents han mostrat que les respostes al tractament més baixes s'associaven amb la positivitat pel VEGF. En segon lloc, l'evidència suporta que el VEGF pot també col·laborar amb el desenvolupament i creixement del LH estimulants les cèl·lules malignes mitjançant un procés autocrí. En una gran varietat de neoplàsies d'origen hematolinfàtic, incloent-hi el LH, s'ha demostrat l'expressió tant del VEGF com dels seus receptors; el receptor VEGFR-2 (Flk-1), receptor que actua com a mediador de la progressió i supervivència tumoral així com en l'angiogènesi, es troba expressat per part de les cèl·lules de HRS³⁸.

Aquestes observacions pensem que donen suport al desenvolupament d'assajos clínics que incloguin tractaments antiangiogènics o teràpies antiVEGF⁹. Les dades preliminars amb l'anticòs monoclonal anti-VEGF Bevacizumab en models animals i en uns pocs pacients mostraven que aquesta teràpia anti-VEGF retardava el creixement d'alloempelts de LH i s'obtenien respostes en casos de LH refractaris⁵³. Interessantment, l'impacte en l'OS hem vist que es limitava als

pacients amb tinció per VEGF positiva i intensa VEGF, suggerint que els pacients amb tinció positiva però dèbil responen al tractament de rescat, la majoria d'ells incloent-hi quimioteràpia d'intensificació. Això podria implicar que aquests casos positius de VEGF es podrien beneficiar d'una teràpia d'inducció més intensiva.

XII. Conclusions

En conclusió, la tinció de VEGF en les cèl·lules HRS està associada amb un risc més gran de recaiguda i una pitjor PFS. Tanmateix, en aquesta sèrie això només ha demostrat influència en la OS en els casos de tinció positiva intensa. Aquest fet podria implicar que aquests casos positius de VEGF puguin necessitar una teràpia d'inducció més intensiva i justificar el desenvolupament d'assajos clínics incloent-hi teràpies antiVEGF o altres fàrmacs antiangiogènics.

XIII. Bibliografia

1. Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science* 235:442-7, 1987
2. Carmeliet P: Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438:932-6, 2005
3. Ferrara N: VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2:795-803, 2002
4. Folkman J: Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 29:15-8, 2002
5. Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, et al: Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 50:1774-8, 1990
6. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, et al: Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84:1470-8, 1989
7. Liekens S, De Clercq E, Neyts J: Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 61:253-70, 2001
8. Bergers G, Benjamin LE: Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3:401-10, 2003
9. Kaban K, Herbst RS: Angiogenesis as a target for cancer therapy. *Hematol Oncol Clin North Am* 16:1125-71, 2002
10. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, et al: Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265:1582-4, 1994
11. DiPietro LA: angiogenic macrophages produce the angiogenic inhibitor thrombospondin 1. *american journal of pathology* 143:678-684, 1993
12. Ferrara N: Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 29:10-4, 2002
13. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, et al: Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 3:391-400, 2004
14. Nagy JA, Vasile E, Feng D, et al: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 196:1497-506, 2002
15. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 13:9-22, 1999
16. Polverini PJ: How the extracellular matrix and macrophages contribute to angiogenesis-dependent diseases. *Eur J Cancer* 32A:2430-7, 1996
17. Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J: Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 438:937-45, 2005
18. Rak J, Filmus J, Kerbel RS: Reciprocal paracrine interactions between tumour cells and endothelial cells: the 'angiogenesis progression' hypothesis. *Eur J Cancer* 32A:2438-50, 1996
19. Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, et al: Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 96:2240-5, 2000
20. Iversen PO: [Angiogenesis and hematological malignancies]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 123:3198-200, 2003

21. Bertolini F: The thin red line: Angiogenesis in normal and malignant hematopoiesis. *experimental hematology* 28:993-1000, 2000
22. Hu Q, Dey AL, Yang Y, et al: Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1, and not receptor 2, is an independent prognostic factor in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cancer* 100:1884-91, 2004
23. F.List A: Vascular endothelial growth factor signaling pathway as an emerging target in hematologic malignancies. *The Oncologist* 6:24-31, 2001
24. Di Raimondo F, Palumbo GA, Azzaro MP, et al: Angiogenesis in acute myeloid leukemia. *Blood* 96:3656-7, 2000
25. Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, et al: Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 150:815-21, 1997
26. Wang ES, Teruya-Feldstein J, Wu Y, et al: Targeting autocrine and paracrine VEGF receptor pathways inhibits human lymphoma xenografts in vivo. *Blood* 104:2893-902, 2004
27. Younes A: Angiogenesis in lymphoma: a short review. *Curr Mol Med* 5:609-13, 2005
28. Foss HD, Araujo I, Demel G, et al: Expression of vascular endothelial growth factor in lymphomas and Castleman's disease. *J Pathol* 183:44-50, 1997
29. Giles FJ, Vose JM, Do KA, et al: Clinical relevance of circulating angiogenic factors in patients with non-Hodgkin's lymphoma or Hodgkin's lymphoma. *Leuk Res* 28:595-604, 2004
30. Pazgal I, Boycov O, Shpilberg O, et al: Expression of VEGF-C, VEGF-D and their receptor VEGFR-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma* 48:2213-20, 2007
31. T.Mainou-Fowler: Micro-vessel density and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived endothelial growth factor (PdEGF) in classical Hodgkin lymphoma (HL). *Leukemia & lymphoma* 47 223-230, 2006
32. Doussis-Anagnostopoulou IA, Talks KL, Turley H, et al: Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed by neoplastic Hodgkin-Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *J Pathol* 197:677-83, 2002
33. Glimelius: angiogenesis and mast cells in lymphoma leukemia, 2005
34. Citak EC, Oguz A, Karadeniz C, et al: Immunohistochemical expression of angiogenic cytokines in childhood Hodgkin lymphoma. *Pathol Res Pract* 204:89-96, 2008
35. Gutierrez A, Mestre F, Ramos R, et al: Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression by Neoplastic Hodgkin-Reed-Sternberg Cells Is An Independent Adverse Prognostic Factor for Relapse in Hodgkin Lymphoma *Blood* 114:1561, 2009
36. Jundt F, Anagnostopoulos I, Bommert K, et al: Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils. *Blood* 94:2065-71, 1999
37. Mestre F, Gutierrez A, Ramos R, et al: Expression of COX-2 Is An Independent Unfavourable Prognostic Factor in Hodgkin Lymphoma Treated with ABVD with or without Radiotherapy. *Blood* 114:1560a, 2009
38. Agarwal B, Naresh KN: Re: Doussis-Anagnostopoulou et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed by neoplastic Hodgkin-Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *J Pathol* 2002; 197: 677-683. *J Pathol* 201:334-5, 2003
39. Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK, Constantinou N, et al: Development and validation of a clinical prediction rule for bone marrow involvement in patients with Hodgkin lymphoma. *Blood* 105:1875-80, 2005

40. Kadin ME, Agnarsson BA, Ellingsworth LR, et al: Immunohistochemical evidence of a role for transforming growth factor beta in the pathogenesis of nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 136:1209-14, 1990
41. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, 2008
42. Hasenclever D, Diehl V: A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med* 339:1506-14, 1998
43. Josting A, Rueffer U, Franklin J, et al: Prognostic factors and treatment outcome in primary progressive Hodgkin lymphoma: a report from the German Hodgkin Lymphoma Study Group. *Blood* 96:1280-6, 2000
44. Ferrara N, Kerbel RS: Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438:967-74, 2005
45. Karayiannakis AJ, Bolanaki H, Syrigos KN, et al: Serum vascular endothelial growth factor levels in pancreatic cancer patients correlate with advanced and metastatic disease and poor prognosis. *Cancer Lett* 194:119-24, 2003
46. Ellis LM, Takahashi Y, Liu W, et al: Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. *Oncologist* 5 Suppl 1:11-5, 2000
47. De Vita F, Orditura M, Lieto E, et al: Elevated perioperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma. *Cancer* 100:270-8, 2004
48. Podar K, Anderson KC: The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood* 105:1383-95, 2005
49. Gerber HP, Malik AK, Solar GP, et al: VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 417:954-8, 2002
50. Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, et al: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 59:728-33, 1999
51. Gratzinger D, Zhao S, Marinelli RJ, et al: Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Am J Pathol* 170:1362-9, 2007
52. Passam FH, Alexandrakis MG, Kafousi M, et al: Histological expression of angiogenic factors: VEGF, PDGFRalpha, and HIF-1alpha in Hodgkin lymphoma. *Pathol Res Pract* 205:11-20, 2009
53. Reiners KS, Gossmann A, von Strandmann EP, et al: Effects of the anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab in a preclinical model and in patients with refractory and multiple relapsed Hodgkin lymphoma. *J Immunother* 32:508-12, 2009